

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : **03-197492**

(43)Date of publication of application : **28.08.1991**

(51)Int.Cl.

C07K	5/10
A61K	37/02
C12P	17/02
//(C12P	17/02
C12R	1:01

(21)Application number : **02-205269** (71)Applicant : **BRISTOL MYERS SQUIBB CO**

(22)Date of filing : **03.08.1990** (72)Inventor : **KONISHI MASATAKA**
HANADA MINORU
NISHIYAMA YUJI

(30)Priority

Priority number : **89 389479** Priority date : **04.08.1989** Priority country : **US**

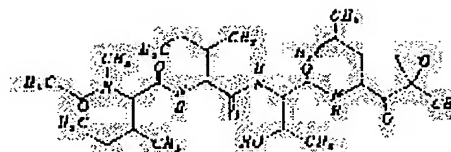
(54) BU-406IT

(57)Abstract:

NEW MATERIAL: A compound of formula. The compound has following physical and chemical properties, white amorphous powder; easily soluble in methanol, methylene chloride and ethyl acetate, and insoluble in water; positive to iodine vapor, ammonium molybdate-sulfuric acid solution and Ridon Smith's reagent, and negative to ninhydrine and anthrone reagent.

USE: Antitumor antibiotics.

PROCESS: Actinomyces Q996-17 (ATCC-53904) strain, or BU-406IT-producing variant or modification strain thereof, is cultured under the depth aerobic condition in an aqueous nutritive culture medium including of C and N as nutrients.



LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

⑫ 公開特許公報(A) 平3-197492

⑤ Int. Cl. ⁵	識別記号	庁内整理番号	⑬ 公開 平成3年(1991)8月28日
C 07 K 5/10	ZNA	8318-4H	
A 61 K 37/02	ADU	8615-4C	
C 12 P 17/02		8931-4B	
/(C 12 P 17/02			
C 12 R 1:01)		8515-4B	
審査請求 未請求 請求項の数 6 (全12頁)			

⑭ 発明の名称 BU-4061T

⑯ 特 願 平2-205269

⑰ 出 願 平2(1990)8月3日

優先権主張 ⑱ 1989年8月4日 ⑲ 米国(US) ⑳ 389479

㉑ 発 明 者 小 西 正 隆 神奈川県川崎市宮前区有馬7-5-7

㉒ 発 明 者 花 田 實 東京都品川区西五反田7丁目15-4

㉓ 発 明 者 西 山 祐 二 東京都台東区蔵前2-15-7-301

㉔ 出 願 人 ブリストル・マイヤー アメリカ合衆国ニューヨーク州 10154 ニューヨーク
ズ スクイブ カンパ パーク アベニュー 345
ニー

㉕ 代 理 人 弁理士 斉藤 武彦 外2名

明細書の浄書(内容に変更なし)

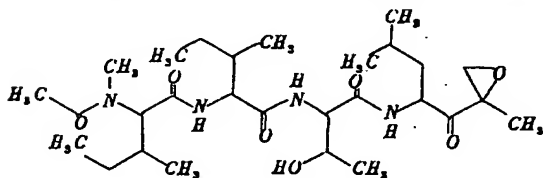
明 細 書

1. [発 明 の 名 称]

BU-4061T

2. [特 許 請 求 の 範 囲]

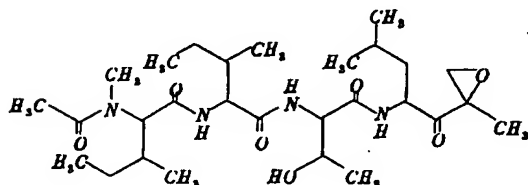
1. 次式を有し、BU-4061Tと命名された化合物。



2. 放線菌属に属するBU-4061T生産菌を培養し、

培養物からBU-4061Tを採取することを特徴とする

次式:



を有するBU-4061Tの製造方法。

3. 放線菌Q996-17(ATCC-53904)株ま

たはそのBU-4061T産生変異株または変種株を、深

部好気条件下、炭素及び窒素の資化源を含有する水性栄養

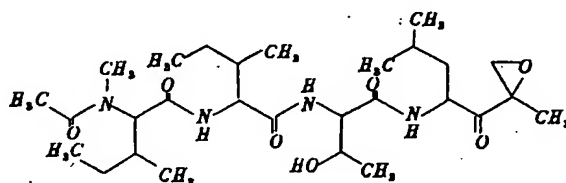
培地中で実質的な量のBU-4061Tが該培地中に該微

生物によつて産生されるまで培養し、次に培養液から該

BU-4061Tを採取するものである請求項2に記載の

方法。

4. 次式:



のBU-4061Tを有効成分とする腫瘍阻止用医薬組成

物。

5. 有効成分のBU-4061Tと不活性で医薬として許容される担体または希釈剤を含んでいる請求項4に記載の組成物。

6. 炭素及び窒素の発化源を含有する水性栄養培地で培養すると、回収可能な量の抗生物質BU-4061Tを産生することのできる放線菌属に属するATCC-53904菌。

3. [発明の詳細な説明]

(産業上の利用分野)

本発明は、本明細書においてBU-4061Tと命名された新規な抗腫瘍抗生物質、その製造法及び実質的に純粋なBU-4061Tの単離精製法に関する。

(従来技術)

米国特許出願第165337号(1988年3月7日出願)には、次式：

- 3 -

てBU-4061Tを有効成分として含有する医薬組成物に関する。

本発明を以下に更に詳しく説明する。

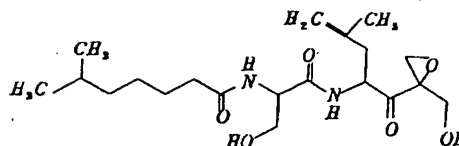
本微生物

BU-4061Tは、放線菌に属する菌株Q996-17またはそのBU-4061T産生変種または変異株を醗酵せしめることにより得られる。

その好ましい産生株で、Q996-17と命名されたものは、インド国アンドーラ プラデシュ州(Andhra Pradesh State, India)で採取された土壌サンプルより分離せしめられた。

本菌の培養特性及び生理学的特性は、Shirling & Gottlieb (*Int. J. Syst. Bacteriol.* 16: 313-340, 1966)及びGordon 氏(*J. Gen. Microbiol.* 109: 69-78, 1978)の

- 5 -



のBU-3862Tと命名された醗酵産物の抗腫瘍抗生物質が開示されている。本BU-4061Tは、上記抗生物質に幾分かの構造上の関連性を有している。

(課題の解決)

本発明は、BU-4061Tと命名された新規な抗腫瘍抗生物質に関する。本発明はまたBU-4061Tの醗酵による製造法に関し、特に、本明細書においてQ996-17(ATCC-53904)株と命名された新規な放線菌に属する菌を用いての製造法に関する。本発明は更にBU-4061Tの醗酵法による製造に用いる新規な微生物、そのBU-4061Tの抗腫瘍剤としての用途、そし

- 4 -

方法によつて調べられた。全細胞の加水分解物中のアミノ酸及び糖の分析は、Lechevalier 氏(*Biochem. Syst. Ecol.* 5: 249-260, 1977)の方法によつて行なつた。メナキノン(menaquinone)のサンプルは、Collins 氏(*J. Gen. Microbiol.* 100: 221-230, 1977)の方法によつて調製され、質量分析器で分析した。ミコール酸及びグリコール酸の検出試験は、それぞれMinnikin 氏(*J. Gen. Microbiol.* 88: 200-204, 1975)及びUchida 及びAida (*J. Gen. Appl. Microbiol.* 25: 169-183, 1979)の方法によつて行なつた。

形態学的性状

基生菌糸は、長く、良く分枝し、桿状形態または球状形態のものへは断片化しない。気菌糸は通常の判定用培地で

- 6 -

は形成されない。不完全な菌糸が、一部の特別な培地、例えばラビット ドウンダ寒天 (rabbit dung agar) またはビタミンB複合体を補った麦芽エキス-酵母エキス寒天でまれに生ずる。これらの菌糸は、次第に細くなる先端を持つ分生子柄束 (基底で2-30 μ mの幅) になっている。分生子柄束の菌糸の先端あるいはその菌糸の部位での胞子の形成は見られない。

培養特性及び生理学的特性 (表1及び2): 基生菌糸の色は、有機培地中ではグレーイッシュユーオリブであり、合成培地では無色又はライトイエローである。メラノイド色素は産生されない。生育温度範囲は、19°C~45°Cである。48°Cではいかなる生育も見られない。

細胞の化学的特性:

細胞全部を加水分解したものには、メソ-ジアミノピメリン酸、ガラクトース、マンノース、リボース及びラムノ

-7-

菌Q996-17は、同定されていない放線菌として記載するのが最もよい。

本放線菌株Q996-17の生物学的に純粋な培養物は、American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, U.S.A. に寄託されており、ATCC-53904として微生物の永久保存株となっている。

本発明は、その特定の菌株あるいはその記載された性状の微生物の使用のみに限定されるものではないことは理解されるべきである。本発明は、通常の方法、例えばX-線、紫外線、ナイトロジェンマスタード類、フーアジにさらすこと等での処理によつて作ることのできる上記微生物のその他のBU-4061T生産菌の変種または突然変異体をも含むことを特に意図している。

抗生物質の産生

-9-

ースを含有していることから、本菌は細胞壁タイプIII及び糖パターンCに属するものである。そのリン脂質としては、ホスファチジルエタノールアミン類、ホスファチジルグリセロール及びホスファチジルイノシトールがあげられることから、それはタイプP-IIに分類される。主要メナキノンはMK-9 (H_4) 及びMK-10 (H_4) である。ミコレートは存在しない。グリコレート試験は陰性であった。

分類学上の位置

Q996-17株は、好気性中温性放線菌であり、胞子を形成しない。化学的な分類では、本菌は、ストレプトアロテイクス (*Streptoalloteichus*)、サツカロトリクス (*Saccharothrix*) 及びアクチノシネマ (*Actinosynema*) に関連したものである。しかしながら、本菌は胞子形成の形態的特性で特徴付けられていないので、上記属のいずれにも分類することができない。かくして、本

-8-

BU-4061Tは、水性栄養培地中深部好気条件下放線菌Q996-17 (ATCC-53904) 株またはそのBU-4061T生産変種株または突然変異株を培養することにより生産することができる。該微生物は、質化性の炭素源、例えば、トレハロース、D-キシロース、D-ソルビトール、可溶性でんぷん、D-リボース、D-メリビオース、D-マンノース、D-マンニトール、マルトース、ラクトース、D-フルクトース、グリセロール等を含有する栄養培地中で生育せしめられる。該栄養培地は、さらに質化性の窒素源、例えば、魚肉ミール、ペプトン、大豆フラワー、ビーナッツミール、綿実ミール、コーンステイプリカー、酵母エキスあるいはアンモニウム塩を含んでいるべきである。無機塩、例えば塩化ナトリウム、塩化カリウム、硫酸マグネシウム、炭酸カルシウム、リン酸塩等が必要なら加えられる。微量元素、例えば銅、マンガン、

-10-

鉄、亜鉛等が、所望なら培地中に加えられるか、あるいはそれらは培地の他の成分の不純物として供給されたものであつてもよい。

*BU-4061T*の生産は、その産生菌の満足しうる生育がなしうるいかなる温度、例えば、19-45℃でも効率的になすことができるが、25-35℃で醗酵を行なうのが好ましく、最も好ましくは27-32℃で行なうのがよい。一般的には抗生物質の生産は約3-7日間で行なわれる。

本醗酵は、各種の大きさのフラスコまたは実験用あるいは工業用のフアメンテーター中で行なうことができる。タンク醗酵が行なわれる場合、斜面培養、ソイルカルチャー (soil culture) または凍結されている培養物の菌体を少量の培養用培地に接種して栄養ブロス中の休止期の接種物を生産することが好ましい。このような方法で活性化

-11-

*BU-4061T*は、白色の無定形粉末として得られる。そのものは、メタノール、メチレンクロライド及び酢酸エチルに非常によく溶け、水に実質的に不溶である。*BU-4061T*は、ヨウ素蒸気、モリブデン酸アンモニウム-硫酸溶液及び *Rydton-Smith* 試薬に陽性を示し、ニンヒドリン及びアンスロン試薬に陰性である。*BU-4061T*の物理化学的性状は表1にまとめて示してある。本抗生物質は特徴的なUV吸収を示さなかつた。そのIRスペクトル (*KBr*錠剤、図1)は、強い1640及び1540 cm^{-1} での吸収を示しており、それは、*BU-4061T*がペプチド系抗生物質に属することを示唆している。*BU-4061T*の $^1\text{H-NMR}$ スペクトル及び $^{13}\text{C-NMR}$ スペクトルはそれぞれ図2及び図3に示されている。*BU-4061T*の $^{13}\text{C-NMR}$ スペクトルは、次のものを含む28個の炭素原子の存在を示している：

-13-

接種物を得た後、*BU-4061T*の大量生産のための醗酵タンク培地中に無菌的に移す。その休止期の接種物を作る場合の培地は、その生産菌が良好に生育する限り、タンクにおけるものと同一でもあるいは異なつていてもよい。醗酵中の攪拌は機械式の攪拌機によつてなすことができ、消泡剤、例えばラード油またはシリコン油が必要なら加えられることができる。

醗酵培地中での*BU-4061T*の生産は、薄層クロマトグラフィーまたは細胞毒性アッセイによつて醗酵途中に容易に見ることができる。

醗酵培地からの*BU-4061T*抗生物質の単離及び*BU-4061T*の精製は、通常の溶媒抽出法やクロマトグラフィー法によつて行なうことができる。好ましい単離精製法は、下記実施例2に具体的に示されたものである。

*BU-4061T*の物理化学的性状

-12-

10個のメチル (δ : 10.5, 11.1, 15.5, 15.6, 16.8, 17.8, 21.1, 22.1, 23.3, 32.1)、4個のメチレン (24.6, 24.7, 39.5, 52.4)、8個のメチン (25.1, 31.9, 36.2, 50.6, 56.4, 58.0, 61.5, 66.5)、1個の第四級体 (59.2) 及び5個のカルボニル炭素 (170.6, 170.8, 171.7, 172.1, 208.3)。

*BU-4061T*の分子式は、 $^1\text{H-NMR}$ 、 $^{13}\text{C-NMR}$ 、マイクロアナリシス及び *SIMS* (m/z 577 ($M + \text{Na}$)⁺, 555 ($M + \text{H}$)⁺) により $\text{C}_{28}\text{H}_{50}\text{N}_4\text{O}_7$ とされた。

構造の研究

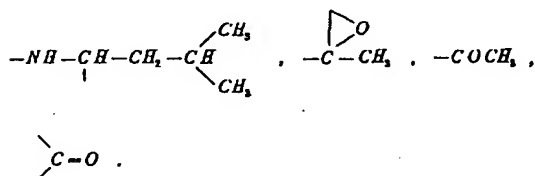
封管中で17時間*BU-4061T*を6*N HCl*でもつて105℃で加水分解した。その加水分解物を水で希釈し、エーテルで抽出した。分離せられた水性相を減圧下濃縮し、凍結乾燥し、158mgの無色油状残留物を得、これは*TLC*

-14-

によつて三つのニンヒドリン陽性物質を含んでいた。それらのうちの二つは、その *TLC* 及びアミノ酸分析の挙動よりスレオニン及びイソロイシンと同定された。この残留物を *Dowex 50W* × 4 (H^+ タイプ、100-200メッシュ、 $\phi 1.5 \times 20 \text{ cm}$) のカラムにかけ、そのカラムを順次 0.03 N 、 0.06 N 、 0.1 N 、 0.3 N 、 0.6 N 、 1 N 及び 3 N の塩酸で溶出した。 0.06 N HCl で溶出され集められたニンヒドリン陽性の分画を濃縮し、さらに *Sephadex LH-20* ($\phi 2.2 \times 100 \text{ cm}$) のカラムのクロマトグラフィーにかけ、12mg のスレオニン塩酸塩の無色シロップを得た。 0.3 N HCl での溶出液を減圧下濃縮し、イソロイシン及び未同定のニンヒドリン陽性物質の混合物を得た。 *Dowex 50W* × 4 (ピリジンタイプ、100-200メッシュ、 $\phi 2.0 \times 75 \text{ cm}$) のカラムクロマトグラフィー法によりそれらを分離した。未知のアミノ酸が 0.1 N ピリジ

-15-

及び $^{13}\text{C-NMR}$ 及び $^1\text{H}-^1\text{H COSY}$ スペクトル(表3)の分析は、*L*-トレオニン、*L*-イソロイシン及び *N*-メチルイソロイシンに加えて次なる部分構造が存在していることを示している：

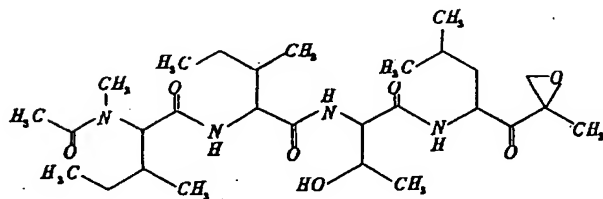


これらのフラグメントの配列は、*BU-4061T* の $^{13}\text{C}-^1\text{H}$ ロングレンジ $COSY$ 及び $EI-MS$ スペクトルを分析して明らかにされ、下記に示す構造が、本抗生物質のものとして決められた。

-17-

ン-ギ酸緩衝液 ($\text{pH } 3.1$) で溶出された。溶出液を減圧下濃縮し、*Sephadex LH-20* のクロマトグラフィー法により脱塩した。適切な分画を溶媒蒸発処理し、12.5mg の白色粉末を得た。この物質は表2に示されるようその *SIMS* スペクトル (m/z : $168 (M+Na)^+$, $146 (M+H)^+$) 及び $^1\text{H-NMR}$ スペクトル及び $^{13}\text{C-NMR}$ スペクトルにより *N*-メチルイソロイシンであると決定された。 0.2 N ピリジン-ギ酸緩衝液 ($\text{pH } 3.1$) で溶出されたイソロイシン含有分画を減圧下に溶媒蒸発し、残留物をエタノール水溶液から再結晶し、5.0mg の無色針状晶を得た。スレオニン及びイソロイシンのキラルリティは、キラル *HPLC* (*TSK* ゲル *ENANTIO L1*、移動相 : $1 \text{ M C}_2\text{SO}_4$ 、検出 : 254 nm 、温度 : 50°C) を用いて決定された。この結果はそれら両方は *L* 配置であることを明確に示している。 *BU-4061T* の $^1\text{H-NMR}$

-16-

表 1 *BU-4061T* の物理化学的性状

性状	: 白色粉末
<i>M.P.</i>	: $107-109^\circ\text{C}$
$[\alpha]_D^{24.5}$: -6.61 ± 0.4 (c 0.5, M_eOH)
$UV \lambda_{max}^{M_eOH}$ nm	: 末端吸収
$IR \nu_{max}^{KBr}$ cm^{-1}	: 3300, 2950, 1720, 1640, 1540
<i>SIMS</i> 実験値 m/z	: 577 ($M+Na$) $^+$, 555 ($M+H$) $^+$
マイクロアナリシス	
計算値 $C_{22}H_{30}N_6O_7$: C 60.62 H 9.09 N 10.10
実験値	: C 60.45 H 9.15 N 10.18
<i>TLC</i> , SiO_2	: $CH_2Cl_2-M_eOH$ 9:1 <i>Rf</i> 0.60 ヘキサナセトン 1:1 0.27

-18-

表 2 ^1H -NMR及び ^{13}C -NMRスペクトル: N -メチルイソロイシン

指定部位	プロトン (D_2O 中) δ (ppm), 強度 (多重度, J :Hz)		炭素 (D_2O 中) δ (ppm), 多重度	
1	—		173.5, s	
2	3.48, 1H (d, 4.0)		69.3, d	
3	1.93, 1H (m)		36.6, d	
4	{ 1.29, 1H (m) 1.53, 1H (m)		26.3, s	
5	0.94, 3H (t, 7.3)		11.9, q	
6	0.97, 3H (d, 6.9)		15.1, q	
$N\text{-CH}_3$	2.70, 3H (s)		33.4, q	

-19-

δ ppm(CDCl_3 中)	強度	多重度 (J :Hz)	指定部位
0.94-1.02	2H	m	CH_2
0.92	3H	d (3.7)	CH_3
0.90	3H	d (3.7)	CH_3
0.82-0.84	12H	m	$\text{CH}_2 \times 4$

生物活性

マウス及びヒトのセルラインに対する *in vitro* 細胞毒性及びマウスに対する *in vivo* の活性について BU-4061T の試験を行なった。

B16-F10 (マウスメラノーマ) 細胞及び Moser (ヒト結直腸癌) 細胞は、胎児牛血清 (FCS, 10%) 及びカナマイシン (60 $\mu\text{g}/\text{ml}$) を補なわれた富化 Eagle 最小必須培地において対数期まで生育させ、一方 HCT-116 (ヒト結腸癌) は、FCS (10%)、ペニシリン (100 μ/ml) 及びストレプトマイシン (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)

-21-

表 3 ^1H -NMRスペクトル: BU-4061T

δ ppm(CDCl_3 中)	強度	多重度 (J :Hz)	指定部位
7.36	1H	d (7.7)	NH
7.29	1H	d (8.1)	NH
6.93	1H	d (7.7)	NH
4.68	1H	d (11.4)	CH
4.52	1H	ddd	CH
4.46	1H	dd (29, 7.7)	CH
4.26	1H	dd	CH
4.24	1H	dq (29, 6.5)	CH
3.31	1H	d (4.9)	CH_2
2.88	1H	d (4.9)	
2.98	3H	s	$N\text{-CH}_3$
2.11	3H	s	CO-CH_3
2.08	1H	m	CH
1.96	1H	m	CH
1.64	1H	m	CH
1.36-1.55	2H	m	CH_2
1.51	3H	s	$\geq\text{C-CH}_3$
1.14-1.36	2H	m	CH_2
1.10	3H	d (6.5)	CH_3

-20-

を補なわれた Mc Coy's 5A 培地中で生育させた。B16-F10、Moser 及び HCT-116 の各細胞を収獲し、それぞれ 3×10^4 、 6×10^4 及び 6×10^4 細胞/ml の接種量で試験化合物を入れた 96-ウェルのマイクロタイターの各ウェル中に植え込んだ。それらを、5% CO_2 及び 95% の空気の湿度付与した雰囲気中で 72 時間 37℃ でインキュベーションした。腫瘍細胞に対する細胞毒性活性は、生細胞を染色した後 540 nm での比色測定によって測定した。BU-4061T は、それぞれ B16-F10 細胞及び HCT-116 細胞に対して非常に良好な細胞毒性活性を示し、 IC_{50} 値 0.0047 及び 0.0067 $\mu\text{g}/\text{ml}$ である。一方 Moser 細胞に対する細胞毒性活性は、B16-F10 及び HCT-116 の細胞に対するそれよりも弱いものであつた (表 4)。

巨大分子 (DNA、RNA 及びタンパク質) 合成におけ

-22-

る $BU-4061T$ の阻害作用は、培養 $B16-F10$ メラノーマ細胞中で測定された。 $B16-F10$ 細胞 (10^5 細胞/ ml) は、酸化合物と共に $37^\circ C$ で 4.5 時間 DNA 合成) または 4 時間 (RNA 及びタンパク質合成) インキュベーションした。標識前駆体 3H -チミジン、 ^{14}C -ウリジン、または 3H -ロイシンを培養物中に加え、さらに 30 分間 (DNA 合成) または 60 分間 (RNA 及びタンパク質合成) インキュベーションする。冷却した 5% トリクロロ酢酸溶液で洗った後、腫瘍細胞の酸不溶性の分画中への放射活性の取り込みを液体シンチレーションカウンターによって測定した。表 5 に示されているように、 DNA 合成及び RNA 合成に対してかなりの阻害作用を有しているが、 $10 \mu g/ml$ の濃度 (最高の試験濃度) においてもタンパク質の分画へのロイシンの取り込みを有意には阻害しなかつた。

-23-

表 4 マウス及びヒトの腫瘍細胞に対する *in vitro*

の細胞毒性活性

化合物	$IC_{50} (\mu g/ml)$		
	$B16-F10$	$HCT-116$	$Moser$
$BU-4061T$	0.0047	0.0067	0.17

表 5 $B16-F10$ メラノーマ細胞における巨大

分子合成の阻害作用

化合物	$IC_{50} (\mu g/ml)$		
	DNA	RNA	タンパク質
$BU-4061T$	16	46	> 100

-25-

$BU-4061T$ の *in vivo* での抗腫瘍活性を測定するため、雄の BDF_1 マウスに $0.5 ml$ の 10% 黒色メラノーマ $B16$ ブライ (brei) を腹膜内接種し、雌 CDP_1 マウスに $0.4 ml$ の希釈した 10^5 個のリンパ球性白血病細胞 $P388$ を含有する腹水を腹膜内接種した。表 6 及び 7 に示すように、両実験においてマイトマイシン C を対照化合物として比較して用いた。試験化合物は、マウスに第 1 日目、第 5 日目及び第 9 日目 ($Q4D \times 3$) または第 1 日目から第 9 日まで ($Q1D \times 9$) 腹膜内投与された。 $BU-4061T$ は、 $Q4D \times 3$ 及び $Q1D \times 9$ のスケジュールのいずれの処理でも $B16$ メラノーマに対して顕著に優れた抗腫瘍活性を示した。 $Q1D \times 9$ の処理スケジュールで試験した場合、その化合物は最小有効投与量及び最大の T/C 値で見た場合に $P388$ システムにおけるより $B16$ システムでより大きな治療活性を示した。

-24-

表 6 B16メラノーマに対するBU-4061Tの抗腫瘍活性 (ip)

化合物	投与量 (mg/kg/day)	処理スケジュール (ip)	MST ^{*1} (day)	T/C (%)	第5日目の体重変化 (%)
BU-4061T	1	Q1D×9	19.0	(146) ^{*2}	-1.3
	0.5	Q1D×9	19.5	(150)	-0.5
	0.25	Q1D×9	18.0	(138)	+0.3
	0.13	Q1D×9	16.0	123	+1.0
	0.063	Q1D×9	15.5	119	+0.3
BU-4061T	4	Q4D×3	16.5	(127)	-1.0
	2	Q4D×3	17.0	(131)	-0.5
	1	Q4D×3	15.5	119	+0.5
	0.5	Q4D×3	15.5	119	-0.3
	0.25	Q4D×3	14.5	112	-0.3
マイトマイシンC	3	Q4D×3	28.0	(215)	-0.3
	1	Q4D×3	18.0	(138)	-0.8
	0.3	Q4D×3	13.0	100	-0.3
賦形剤のみ	—	Q4D×3	13.0	—	+0.

*1 平均生存時間

*2 円で囲まれたものは顕著な抗腫瘍作用を示している (T/C ≥ 125%)

-26-

表 7 P388白血病に対するBU-4061Tの抗腫瘍活性 (ip)

化合物	投与量 (mg/kg/day)	処理スケジュール (ip)	MST ^{*1} (day)	T/C (%)	第4日目の体重の変化 (%)
BU-4061T	1	Q1D×9	10.5	105	-1.3
	0.5	Q1D×9	13.0	(130) ^{*2}	-1.5
	0.25	Q1D×9	11.5	115	-0.3
	0.13	Q1D×9	11.0	110	-0.5
	0.063	Q1D×9	10.5	105	+0.3
マイトマイシンC	1	Q1D×9	17.0	(170)	-0.8
	0.5	Q1D×9	15.5	(155)	0.0
	0.25	Q1D×9	13.0	(130)	+1.0
	0.13	Q1D×9	12.0	120	+1.3
	0.063	Q1D×9	11.0	110	+0.8
賦形剤のみ	—	Q1D×9	10.0	—	+0.8

*1 平均生存時間

*2 円で囲まれたものは、顕著な抗腫瘍作用を示している (T/C ≥ 125%)

-27-

治療学的用途

上記したように *BU-4061T* は哺乳動物の悪性腫瘍に対して顕著な抗腫瘍活性を有している。

本発明の一つの目的は、*BU-4061T* に感受性を有する悪性腫瘍の影響を受けている哺乳動物宿主に *BU-4061T* またはその医薬組成物を投与して治療するにある。

本発明の別の目的は、活性成分として *BU-4061T* を含有し、更には不活性な医薬として許容しうる担体または希釈とからなる医薬組成物、特に腫瘍阻止用の医薬組成物に関する。このような組成物はその他の抗腫瘍剤を含有していてもよく、所望の投与形態に適したあらゆる形態にされていてもよい。そのような組成物の例としては、経口投与用の固体の組成物、例えば錠剤、カプセル剤、丸剤、粉末剤及び顆粒剤、あるいは経口投与用の液体の組成物、

-28-

次なる具体的な記載は、単に本発明を説明するためのものであつて、本発明の範囲を限定する意図はない。

実施例 1.

BU-4061T の醗酵生産

A. フラスコ醗酵

良好に生育した寒天斜面培地の放線菌 *Q996-17* 株を、可溶性でんぷん (*Nichiden Kagaku*) 2%、大豆ミール (*Nikko Seiyu*) 1% 及び CaCO_3 0.5% から成る種菌用培地 (殺菌前の pH 7) 100 ml を含有する 500 ml のエルレンマイヤーフラスコ中に接種した。接種されたフラスコを回転式振とう機 (200 rpm) 上で 4 日間 32℃ でインキュベーションした。5 ml の培養物を、種菌用培地と同じ組成を有する生産用培地 100 ml を含有する 500 ml のエルレンマイヤーフラスコに移した。醗酵を回転式振とう機上で 6 日間～7 日間 28℃ で行なつた。

-30-

例えば溶液剤、懸濁剤、シロップ剤またはエリキシル剤、さらには非経口投与のための調製物、例えば無菌溶液、懸濁剤、または乳濁化剤があげられる。それらはまた、使用直前に無菌水、生理的食塩水またはその他の注射することのできる媒体中に溶解されることのできる無菌の固体組成物の形態のものであつてよい。

ある哺乳動物宿主のための最適な *BU-4061T* の投与量等は、当業者にとっては容易に確認できるようなものである。実際の *BU-4061T* の使用投与量は、特定の製剤化された組成物、投与の方法、処理さるべき部位、宿主及び病状にしたがつて変えられることは勿論賞揚されよう。年齢、性別、体重、食事、投与時間、投与経路、排泄の速度等、患者の病状、薬物の組合せ、反応性の感度及び病状の深さく度といった点を考慮して該薬物の作用を修飾する多くの因子が決められる。

-29-

醗酵プロセス中の抗生物質の生産を *B16* メラノーマ細胞に対する *in vitro* 細胞毒性活性によつてモニターした。6 日間の培養でその生産は最大値に達し、その細胞毒性活性は、*MEC* (最小有効濃度) で $\times 256$ 倍希釈に達した。

B. タンク醗酵

大量醗酵を、単一コロニー単離法を用いて *Q996-17* 株から誘導せしめられた *Q996-17-A1* 単離体を用いタンクフアーメンテーター中で行なつた。タンク醗酵用の種菌用培養物として、回転式振とう機 (200 rpm) 上で 3 日間 32℃ で 25 個のエルレンマイヤーフラスコ (500 ml) を培養した。2 l の種菌用培養物を、前記生産培地の 120 l を含有する 200 l のタンクフアーメンテーターに移した。醗酵を 120 l/min の通気及び 250 rpm の撹拌下 28℃ で行なつた。醗酵プロセス中の細胞毒

-31-

性活性は、138時間の酸酵後×1024倍希釈のMECに達した。

実施例 2.

BU-4061Tの抽出及び精製

実施例1の方法に従って得られた酸酵培地全部(45ℓ、pH 8.3)を激しく攪拌しながらn-ブタノール(16ℓ)で抽出した。その有機相を連続遠心及び減圧濃縮を用いて分離した。次に濃縮物(1ℓ)をそれぞれ0.7ℓの酢酸エチルで2回抽出した。一緒にされた抽出液を減圧下に濃縮し、油状残留物とし、それを攪拌下2ℓのn-ヘキサン中に滴下して加えた。沈降した沈殿物を濾過して集め、乾燥して、BU-4061Tの粗製固体(29.9g)を得た。水中に懸濁された固体(100mg)をダイアイオン(Diaion)HP-20(Mitsubishi Chem. Industries, Tokyo, φ4.0×70cm)にかけた。水

-32-

を得た。最終的な精製はメタノール溶出によるSephadex LH-20カラムクロマトグラフィーによつて行なつた。目的分画を濃縮して均一な白色粉末のBU-4061T(100mg)を得た。

4. [図面の簡単な説明]

図1は、BU-4061T(KBr錠剤)の赤外吸収スペクトルを示すものである。

図2は、BU-4061Tの¹H-NMRスペクトルを示すものである。

図3は、BU-4061Tの¹³C-NMRスペクトルを示すものである。

-34-

(3ℓ)、30%メタノール水溶液(3ℓ)、50%メタノール水溶液(3ℓ)及び80%メタノール水溶液で、順次溶出した。BU-4061Tを含有する分画を、B16メラノーマ細胞に対する細胞毒性によつて検出を行なつた。80%メタノール水溶液で溶出された活性を有する分画を減圧下濃縮し(4.48g)、残留物をシリカゲルカラム(φ4.0×50cm)上のクロマトグラフィーにかけ、メチレンクロライド/メタノール(98:2v/v)で溶出した。活性な分画を集め、減圧下に濃縮して、淡黄色固体4.42gを得た。この固体を少量の酢酸エチルに溶解して、シリカゲルカラム(φ2.2×50cm)にかけ、そのカラムを酢酸エチルで展開して、ほぼ純粋な固体を得た。このものをさらに逆相シリカゲル(φ2.2×30cm)のクロマトグラフィーにかけた。55-60%のメタノール水溶液で溶出して、ほぼ均一な固体のBU-4061T(124mg)

-33-

FIG. 1
BU-4061T の赤外吸収スペクトル

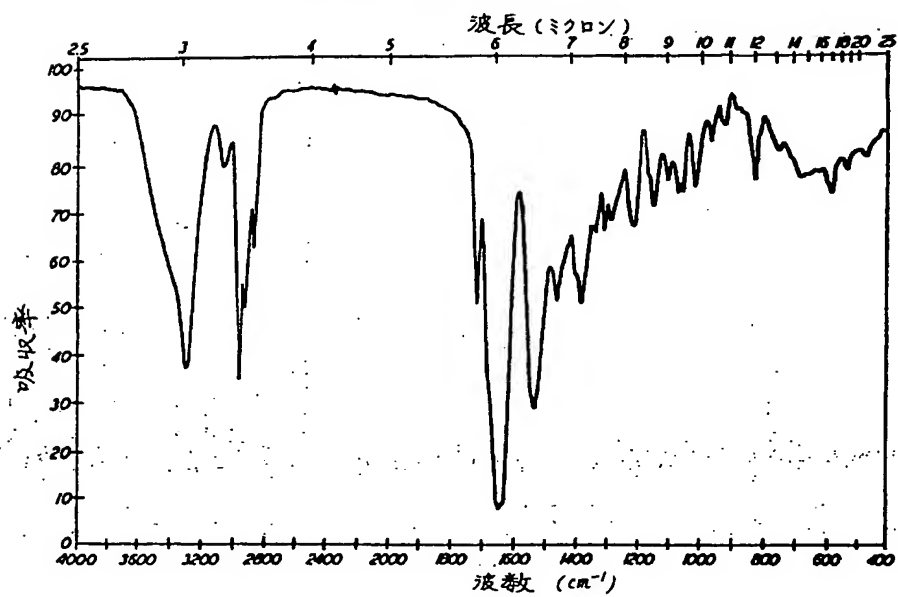


FIG. 2
BU-4061T の ¹H-NMR スペクトル

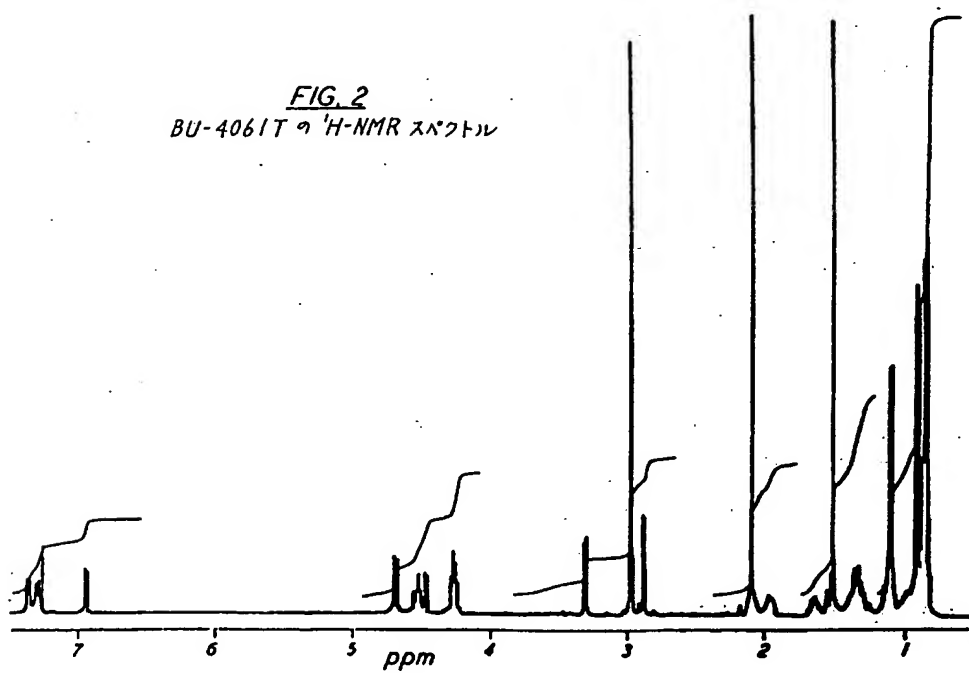
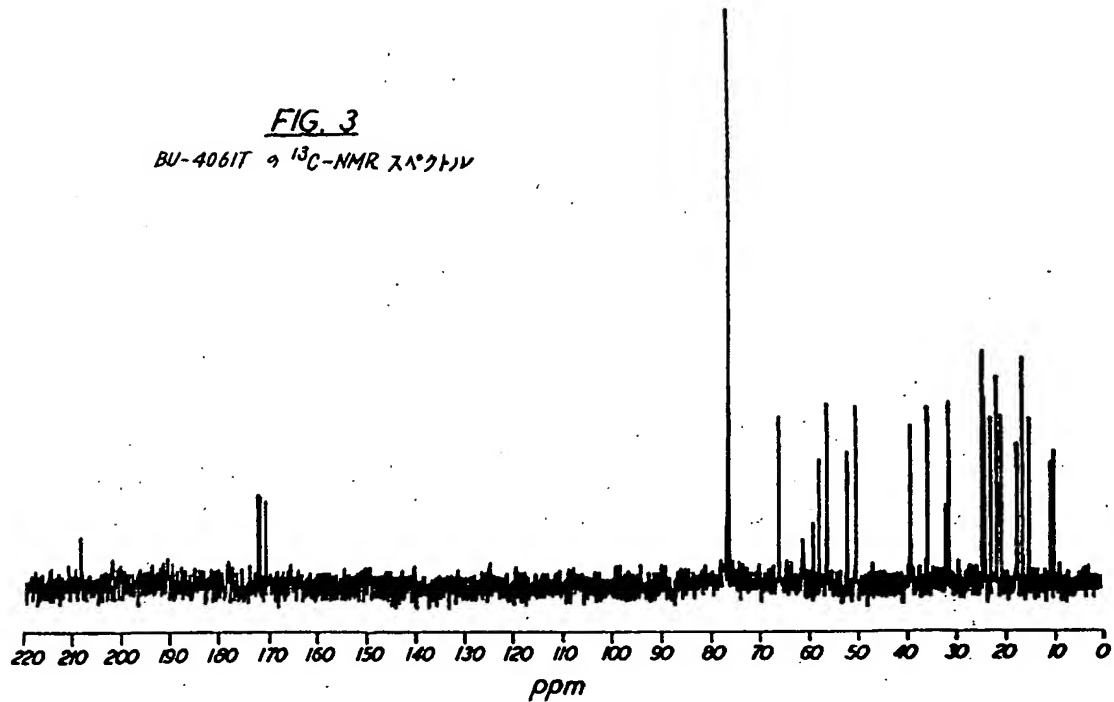


FIG. 3

BU-4061T の ^{13}C -NMR スペクトル



手 続 補 正 書

平成 2 年 8 月 3 0 日

特許庁長官 植 松 敏 殿

1. 事件の表示

平成 2 年特許願第 2 0 5 2 6 9 号

2. 発明の名称

B U - 4 0 6 1 T

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

名称 ブリストル・マイヤーズ スクイブ カンパニー

4. 代 理 人

1 0 7

住所 東京都港区赤坂 1 丁目 1 番 1 8 号
赤坂大成ビル (電話 5 8 2 - 7 1 6 1)

氏名 弁理士 (7 1 7 5) 齊 藤 武 彦



5. 補正の対象

願書に添付の手書き明細書のタイプ浄書

6. 補正の内容

別紙のとおり、但し明細書の内容の補正はなし

方 式 査 査 (市 川)

